

# Behaviour of tissue enzymes in the circulation

## Citation for published version (APA):

van Dieijen-Visser, M. P. (1981). Behaviour of tissue enzymes in the circulation. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

## Document status and date:

Published: 01/01/1981

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## CHAPTER VIII

### Conclusions and summary

Normally only very small amounts of tissue enzymes are present in the circulation, but after tissue injury the levels of tissue enzymes in plasma increase, due to leakage of enzymes from damaged cells. In this thesis the behaviour of tissue enzymes in the circulation is studied in order to validate and improve methods presently used for the quantitation of tissue damage on the basis of enzyme levels in plasma.

A considerable part of the results presented in this thesis is obtained from intravenous and intramuscular injections and intravenous infusions of enzymes in the dog. These animals are commonly used in experimental models to study enzymatic infarct quantitation. Enzyme preparations as used for the experiments were obtained from dog heart or liver. Pieces of heart or liver tissue were incubated in dog plasma under hypoxic conditions. Under these conditions enzymes leak from the tissue into the plasma, which was hereafter centrifuged and used for the experiments.

In most studies enzymatic infarct size is expressed in grams of necrotic tissue. In order to obtain the weight of necrotic tissue in grams the calculated total activity of enzyme released into the circulation has to be divided by the mean enzyme activity per gram of normal tissue. Selection of enzymes with small intra- and inter-individual variations in tissue enzyme content will minimize errors in this procedure.

We observed that for (1) CK, LD, GPI and (2) ALT enzyme activity is rather homogeneously distributed throughout respectively heart and liver tissue of the dog. Variations in enzyme activity per gram of normal tissue, in samples taken from various sites of the same organ are less than 5-7%. Inter-individual variations in enzyme activity per gram of normal tissue were 5-10%. The use of a mean value for the enzyme content of normal tissue will therefore introduce only a small error in the quantitation of acute heart or liver tissue damage.

Since 1971 creatine kinase (CK) is commonly used in diagnosis and quantitation of acute myocardial infarction. A correct estimation of CK clearance rate from the circulation is essential for a reliable

estimation of enzymatic infarct size. When the work for this thesis was started there existed a controversy in the literature on the model to describe the clearance and distribution of CK activity after intravenous injection in the dog. With the experiments described in chapter V we were able to solve this controversy. Infusion of enzymes at a constant rate allowed us to a model independent estimation of enzyme clearance constants.

We conclude that for rapidly cleared enzyme, *i.e.* half-lives of less than 3-5 hours, with molecular weights larger than 40,000 - 60,000 Daltons, diffusion to the extravascular space can be neglected, as compared to the clearance rate from the circulation and a one-compartment model is sufficient to describe the clearance and distribution of these enzymes. For slowly metabolized enzymes like ALT diffusion to the extravascular space cannot be neglected and clearance and distribution of such enzymes is best described by a two-compartment model (*cf.* chapter V).

From the literature (Tables I and II, chapter II) and from the results presented in chapters V and VI we conclude that enzymes with molecular weights exceeding 40,000 - 60,000 Daltons extravasate with a rate of 1-4% per hour. Extremely fast extravasation of enzymes with high molecular weights, *i.e.* transcapillary escape rates of 20-50% per hour as have been reported even in the recent literature (Table II, chapter II), are attributed to the presence of quickly metabolized, partly denatured fractions of enzyme activity in the preparations and not as has been suggested to a distribution of enzyme activity over different compartments.

Part of the contradictions in earlier work on the clearance of enzyme activity from the circulation were caused by use of different and/or inferior enzyme preparations. In chapter VII we describe a method to investigate the stability and homogeneity of enzyme preparations used for *in vivo* studies. *In vitro* thermal inactivation of enzymes at higher temperatures was used to analyze the stability and homogeneity of the enzyme preparations. It was assumed that differences in molecular conformation of an enzyme would be reflected in a different thermal stability of the enzyme. If this assumption is correct thermal inactivation curves at higher temperatures could be used to detect inhomogeneities and instabilities in the enzyme preparations. We demonstrated a preparation-dependent variation in the *in vivo* clearance constant of AST. Using enzyme preparations of the same

thermal stability the inter-individual variation in AST clearance rate could be reduced to 7-10%. Variation in CK clearance rates appeared to be mainly animal dependent and not preparation dependent. All CK preparations used were of equal thermal stability. From the results presented in chapter VII we conclude that there is no relation between physical parameters like molecular weight, thermal stability or thermodynamic activation parameters and the *in vivo* clearance rate of enzymes from the circulation. It should be noted however that in order to establish such a relationship above mentioned parameters should be determined for considerably more enzymes, but even the trend did not become apparent from our data.

In most experimental studies enzymatic infarct size has been related to histologically assessed infarct size. The latter method is based upon specific staining techniques, marking either the damaged or the undamaged tissue. After excision and weighing of the damaged tissue the amount of tissue injury can be expressed in terms of grams of injured tissue. Histological assessment of infarct size has however a considerable experimental error, which may cause a poor correlation with enzymatic infarct quantitation.

Therefore in our study plasma enzyme patterns comparable to those obtained after myocardial infarction were simulated by varying the rate of intravenous infusion of the enzyme preparation. The amount of enzyme infused was quantitated from the enzyme levels appearing in plasma and compared to the true amount of enzyme administered. This experimental set-up allows a very reliable check on methods presently used to estimate tissue damage from plasma enzyme levels.

To quantitate the total activity infused a method was used, which allows estimation of individual clearance constants of rapidly cleared enzymes (AST or GPI), using a simultaneously measured slowly cleared enzyme (ALT) as a reference.

The use of fixed mean values of the clearance constants of these enzymes, *i.e.*  $k_{ALT} = 0.034 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{AST} = 0.19 \text{ h}^{-1}$  and  $k_{GPI} = 0.38 \text{ h}^{-1}$  resulted in errors of respectively 7.7%, 17 % and 24% for the mean recoveries of ALT, AST and GPI activities in plasma.

Comparison of these values with variations of respectively 12% and 17% obtained with individual estimates of AST and GPI clearance rates and variations of respectively 11% and 9% due to errors in the fitting procedure, as judged from computer simulations, we conclude that for AST as well as GPI the use of individual estimates of clearance rates

results in a reduced error in the calculated recovery. The best results were however obtained with the slowly metabolized enzyme ALT, using the mean value of the clearance constant.

Some additional factors, which may affect enzymatic quantitation of tissue damage are: (1) incomplete release of enzyme activity from necrotic cells, (2) local inactivation of enzyme activity at the place of tissue injury and (3) extravascular inactivation of enzyme activity.

In the present study intramuscular injections of AST and ALT activity in the gluteus muscle of the dog were used to estimate the amount of enzyme activity eventually recovered in plasma.

We demonstrated that after intramuscular injections at least 75% of the ALT activity administered was recovered in plasma, whereas the recovery for AST was 86%.

These results are in striking contrast to the low recovery of CK activity in plasma after acute myocardial infarction, as has been reported in the literature. This low recovery is probably introduced because CK shows accelerated denaturation in dog lymph. After intramuscular injection ALT and AST release from muscle continued up to 40-50 hours after injection. These results indicate that especially for AST, an enzyme with a half-life of 3.5 hours, as estimated from plasma activity curves after intravenous injection of the activity, there is very few local inactivation at the site of injection or during transport through the interstitial fluid. The high recoveries in plasma indicate that catabolism of these enzymes occurs in the vascular pool or in immediate contact with this pool and not in the extravascular space.

## Conclusies en samenvatting

Dit proefschrift handelt over het gedrag van weefselenzymen in de circulatie. Weefselenzymen catalyseren specifieke biologische reacties in de cel. Onder normale, niet-pathologische omstandigheden komen deze enzymen slechts in zeer geringe concentraties voor in de circulatie, de zogenaamde normaalwaarde.

Storingen in de celfunctie, veelal veroorzaakt door een tekort aan voldoende cellulaire energie om de normale physiologische processen in de cel te laten verlopen, leiden tot een verhoogde permeabiliteit van de celwand. Dit geeft aanleiding tot het vrijkomen van intracellulaire enzymen en andere stoffen in de interstitiële ruimte en in de circulatie. Het feit dat elk enzym meestal slechts één biologische reactie catalyseert maakt het mogelijk om met een grote gevoeligheid en specificiteit de concentratie van een enzym, in bijvoorbeeld een plasmamonster te bepalen.

Elk celtype heeft een karakteristiek enzympatroon. Levercellen bijvoorbeeld, vervullen een belangrijke rol in de afbraak en synthese van eiwitten en bevatten dan ook een relatief hoge concentratie transaminases, die nodig zijn bij de omzetting van aminozuren. Spiercellen daarentegen bevatten relatief weinig transaminases, maar wel een hoge concentratie creatine kinase, een enzym dat verantwoordelijk is voor de opslag van energie in de vorm van creatine fosfaat. Beschadiging van een bepaald celtype, geeft aanleiding tot een karakteristiek enzympatroon in het plasma, dat kan worden gebruikt om de plaats van de beschadiging vast te stellen. Weefsel specifieke enzymen, isoenzymen en karakteristieke enzymquotienten in het plasma zijn een belangrijk hulpmiddel geworden bij de diagnose van een groot aantal ziekten.

Het uiteindelijke niveau van intracellulaire enzymen in het plasma is afhankelijk van het aantal beschadigde cellen, maar ook van de afbraaksnelheid van het enzym in de circulatie en de duur van de uitstorting uit het weefsel.

In een aantal studies is een significante, hoewel niet indrukwekkende relatie gevonden tussen de maximale enzymactiviteit in het plasma en de histologisch bepaalde infarctgrootte. De histologische infarctgrootte wordt bepaald met behulp van specifieke kleuringstechnieken, die ofwel het necrotische dan wel het niet-necrotische (vitale) weefsel kleuren. Na uitsnijden en wegen wordt de totale weefselschade

uitgedrukt in het aantal grammen necrotisch weefsel. Het feit dat de correlaties tussen de maximale enzymactiviteit in het plasma en de histologische infarctgrootte onvoldoende zijn voor een nauwkeurige schatting van de infarctgrootte uit plasmamonsters in individuele gevallen, is het gevolg van factoren als het nemen van onvoldoende plasmamonsters, individuele verschillen in de verdwijningsconstanten, maar ook van experimentele fouten bij het bepalen van de histologische infarctgrootte.

In modellen die de verdwijning van eiwitten uit de circulatie beschrijven moet dan ook rekening worden gehouden met verschijnselen als: het diffunderen van eiwit naar de extravasculaire ruimte, terugkeer van eiwit vanuit de extravasculaire ruimte en afbraak in de circulatie. Enzymen verdwijnen uit de circulatie met snelheden die karakteristiek zijn voor zowel het enzym als voor de species. Daarnaast bestaat binnen één species ook nog een belangrijke interindividuele variatie in de verdwijningssnelheid van een enzym.

Sinds 1971 wordt gebruik gemaakt van verschillende modellen om acute weefselschade te quantiteren aan de hand van enzymniveaus in het plasma. Tot op heden zijn zowel redelijk goede als slechte resultaten verkregen.

Het doel van dit onderzoek is de bestaande methodes om acute weefselschade te quantiteren te valideren en verbeteren. Het merendeel van de resultaten werd verkregen uit intraveneuze en intramusculaire injecties en intraveneuze infusen in de hond. De hond is het standaard proefdier in experimentele modellen om enzymatische infarctgrootte te bestuderen. De enzympreparaten werden verkregen door stukjes hart of leverweefsel onder hypoxische omstandigheden te incuberen in hondenplasma, waarbij de enzymen uit het weefsel lekken en in het plasma komen. Het plasma werd vervolgens afgedraaid en gebruikt voor de experimenten.

De enzymatische infarctgrootte wordt meestal uitgedrukt in het aantal grammen necrotisch weefsel. Dit is uitsluitend gerechtvaardigd voor die enzymen waarvoor zowel de intra- als de interindividuele variaties in de enzyminhoud per gram weefsel klein zijn. Wij vonden dat voor: (1) CK, LD, GPI en voor (2) ALT de enzymactiviteit redelijk homogeen verdeeld is over respectievelijk hart- en leverweefsel. De variaties in de enzymactiviteit per gram weefsel, in monsters genomen op verschillende plaatsen in hetzelfde orgaan liggen rond de 5-7%. Interindividuele variaties in de enzymactiviteit per gram weefsel

liggen rond de 5-10%.

Het gebruik van de gemiddelde waarde voor de enzymactiviteit per gram normaal weefsel, in plaats van individuele waarden zal derhalve voor de bovengenoemde enzymen slechts een zeer geringe fout introduceren bij de quantitering van acute hartspier of leverschade.

Bij de berekening van de enzymatische infarctgrootte en meer algemeen bij de studie van het eiwitmetabolisme speelt de afbraaksnelheid van een enzym, meestal uitgedrukt in de eerste-orde verdwijningsconstante  $k$ , een belangrijke rol.

Bij de diagnose en quantitering van acute hartspierschade wordt veelal gebruik gemaakt van het enzym creatine kinase. Toen met het werk voor dit proefschrift werd aangevangen bestond er in de literatuur een belangrijke controverse over het model om de verdwijning van CK uit de circulatie zo exact mogelijk te beschrijven. De experimenten beschreven in hoofdstuk V brachten de bestaande controverse tot een oplossing. Een methode waarbij enzymen met een constante snelheid werden geïnfundeerd stelde ons in staat tot een model onafhankelijke schatting van de verdwijningsconstante van een enzym.

Wij concluderen dat voor enzymen, die relatief snel worden afgebroken, een halfwaardetijd kleiner dan 3-5 uur, en een molecuulgewicht groter dan 40.000-60.000 Daltons hebben, de diffusie naar de extravasculaire ruimte verwaarloosbaar is t.o.v. de afbraaksnelheid van deze enzymen in de circulatie en een één-compartiment model is voldoende om de verdwijning van deze enzymen uit de circulatie te beschrijven. Voor langzaam afgebroken enzymen, zoals ALT is de diffusie naar de extravasculaire ruimte niet meer te verwaarlozen en is een twee-compartimenten model noodzakelijk.

Uit de resultaten beschreven in hoofdstuk VI is geconcludeerd dat eiwitten met een molecuulgewicht groter dan 40.000-60.000 Daltons met een snelheid van 1-4% per uur naar de extravasculaire ruimte diffunderen. Dit resultaat is in overeenstemming met studies van radioactief gelabelde plasma-eiwitten, maar zelfs in zeer recente literatuur worden nog transcapillaire verdwijningssnelheden van 20-50% per uur gevonden voor enzymen. Deze resultaten zijn waarschijnlijk toe te schrijven aan de aanwezigheid van snel gemetaboliseerde fracties in de enzympreparaten en niet aan de gesuggereerde verdeling van de enzymen over meerdere compartimenten.

Het reticuloendotheliale systeem blijkt een belangrijke rol te spelen bij de verdwijning van niet-natieve eiwitmoleculen uit de



circulatie. De snelle verwijdering van beschadigde eiwitmoleculen uit de circulatie kan worden gezien als een bescherming van het organisme tegen beschadigde of anderszins veranderde moleculen.

In hoofdstuk VII is derhalve gezocht naar een methode om de samenstelling van de gebruikte enzympreparaten te analyseren. *In vitro* thermische inactivering van de enzymen bij hoge temperatuur is gebruikt om de homogeniteit en de stabiliteit van de enzympreparaten te bepalen. Verschillen in moleculaire conformatie van een enzym zouden immers mogelijk tot uiting kunnen komen in een veranderde thermische stabiliteit. Wanneer deze veronderstelling correct is zouden thermische inactiverings curves kunnen worden gebruikt om de homogeniteit en stabiliteit van de enzympreparaten te bepalen.

Voor AST werd een preparaat afhankelijke variatie in de *in vivo* verdwijningssnelheid gevonden. Indien gebruik gemaakt wordt van preparaten van identieke thermische stabiliteit kan de interindividuele variatie in de AST verdwijningsconstante worden beperkt tot 7-10%. Er was geen verschil in de *in vitro* thermische stabiliteit van de CK preparaten. De variatie in de CK verdwijningsconstante blijkt eerder hond- dan preparaat-afhankelijk.

Uit de resultaten vermeld in hoofdstuk VII hebben wij geconcludeerd dat er voor de bestudeerde enzymen geen relatie bestaat tussen fysische parameters als molecuulgewicht, thermische stabiliteit of thermodynamische activeringsparameters en de *in vivo* verdwijningssnelheid uit de circulatie.

Zoals vermeld kunnen fouten in de bepaling van de histologische infarctgrootte slechte correlaties met de enzymatische methode veroorzaken. Daarom werden in onze studie enzym patronen in plasma, vergelijkbaar met die na een hartinfarct, gesimuleerd door de snelheid waarmee de preparaten werden geïnfundeerd te variëren. De hoeveelheid geïnfundeerde enzymactiviteit werd vervolgens geschat op basis van de enzymniveaus in het plasma en direct vergeleken met de in werkelijkheid toegediende hoeveelheid enzymactiviteit. De totale hoeveelheid geïnfundeerde enzymactiviteit werd bepaald aan de hand van de enzymniveaus in het plasma, met behulp van een methode die ons in staat stelt de individuele verdwijningsconstanten van snel afgebroken enzymen (AST en GPI) te bepalen, gebruik makend van een gelijktijdig gemeten referentie enzym (ALT).

Het gebruik van vaste gemiddelde waarden voor de verdwijningsconstanten van deze enzymen, *i.e.*  $k_{ALT} = 0.034 \text{ h}^{-1}$ ,  $k_{AST} = 0.19 \text{ h}^{-1}$  en GPI =

$0.38 \text{ h}^{-1}$  resulteerde in fouten van respectievelijk 7.7%, 17% en 24% voor de geïnfundeerde hoeveelheid ALT, AST en GPI. Vergelijken we deze waarden met variaties van 12% en 17% verkregen met individuele schattingen van de AST en GPI verdwijningssnelheden en variaties van respectievelijk 11% en 9% geïntroduceerd door fouten in de procedure (geschat m.b.v. computer simulaties) dan kunnen we concluderen dat zowel voor AST als voor GPI het gebruik van individuele schattingen van de verdwijningsconstanten resulteert in een geringere fout. De beste resultaten werden echter verkregen met het langzaam afgebroken enzym ALT, zelfs indien gebruik werd gemaakt van de gemiddelde waarde voor de ALT verdwijningsconstante, d.w.z. de interindividuele variaties in deze grootte worden verwaarloosd.

Andere factoren die een invloed kunnen hebben op de enzymatische quantitering van weefselschade zijn: (1) onvolledige uitstorting van enzymactiviteit uit necrotische cellen, (2) locale inactivering van enzymactiviteit op de plaats van de weefselbeschadiging en (3) extra-vasculaire afbraak van enzymactiviteit.

Intramusculaire injecties, diep in de gluteus spier van de hond, werden gegeven om de totale hoeveelheid enzymactiviteit die uiteindelijk vanuit de spier in de circulatie terechtkomt te schatten. Na een intramusculaire injectie wordt gedurende 40-50 uur enzymactiviteit in het plasma uitgestort. Het bleek dat na intramusculaire injectie ten minste 75% van de totaal toegediende hoeveelheid ALT uiteindelijk in het plasma terechtkomt, terwijl voor AST tenminste 86% van de geïnjecteerde activiteit in het plasma verschijnt. Deze resultaten staan in sterke tegenstelling tot de lage opbrengst zoals in de literatuur beschreven voor CK, na een acuut myocardinfarct. Deze lage opbrengst is vermoedelijk te verklaren door een snelle inactivering van CK activiteit in de lymfe. Deze resultaten bevestigen dat speciaal voor AST er zeer weinig inactivering is op de plaats van injectie, maar ook tijdens het transport van de spier via de lymfe en/of de interstitiële ruimte naar het plasma. De hoge opbrengsten in plasma voor AST en ALT duiden aan dat de afbraak van deze enzymen in het plasma compartiment of in de onmiddellijke nabijheid van dit compartiment plaatsvindt.